



青島農業大學

# 学士学位论文

题 目	食用菌基因组提取与 PCR 模板快速制备技术
姓 名	徐林林
学 号	20170203451
学 院	生命科学学院
专 业	生物技术（食用菌）
班 级	201701
指导教师	于浩

二〇二一年五月

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年 月 日

## 学位论文版权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：

年 月 日

指导教师（签名）：

年 月 日

## 食用菌组织基因组提取与 PCR 模板快速制备技术研究

**摘要：**高质量、简单、快速的基因组提取方法是进行分子操作、PCR 检测的重要基础。但是目前并没有针对食用菌的高效、简单、快速的基因组提取方法和 PCR 模板快速制备方法的详细研究。本论文采用 4 中方法对食用菌菌丝组织的基因组提取进行了研究，结果发现提取液 A 法可以较好的提取食用菌菌丝组织的基因组。本研究使用了 4 种提取液对食用菌菌丝、新鲜子实体组织、烘干的子实体和多孔菌子实体的基因组进行了快速提取并进行了 PCR 反应，结果表明利用提取液 A 法能够有效制备菌丝、子实体组织、多孔菌子实体的 PCR 反应的基因组模板，碱裂解法对于烘干子实体的基因组提取效果最好。本研究还研究了试纸条法进行食用菌组织基因组 PCR 模板的快速纯化研究，结果表明试纸条法也具有较好的提取效果。本研究将为食用菌组织的快速鉴定提供实验基础。

**关键词：**食用菌；基因组；琼脂糖凝胶电泳；PCR；提取

## **Research on edible fungus tissue genome extraction and rapid preparation of PCR template**

**Abstract:** High-quality, simple and fast genome extraction methods are an important basis for molecular operation and PCR detection. But there is no detailed study on the efficient, simple and rapid genome extraction method and the rapid preparation method of PCR templates for edible fungi. In this paper, four methods of genomic extraction of edible fungi mycelium were compared, and the results showed that extract A agent can get the best extract genome in edible mycelium tissue. In this study, four kinds of reagents were used to extract the genomics of edible fungi mycelium, fresh fruiting body tissue, dried fruiting body and porous fruiting body, and then PCR reaction were carried out with these as templates. The results showed that the genomic templates of mycelium, fruiting body tissue and porous fruiting body could be effectively prepared by using extract A method, and alkaline lysis method was the best method for genomic extraction of dried fruit bodies. In this paper, the rapid purification process of PCR template of edible fungi tissue genome was also studied by using the strip method. The results showed that the strip method also had good extraction effect. This study will provide experimental basis for rapid identification of edible fungi.

**Key words:** Edible fungi; genome; agarose gel electrophoresis; PCR; extraction

# 目 录

1 文献综述.....	1
2 材料与方法.....	2
2.1 材料与试剂.....	2
2.1.1 材料.....	2
2.1.2 试剂.....	2
2.1.3 实验仪器.....	2
2.2 食用菌菌丝组织基因组提取.....	2
2.3 PCR 快速扩增制备基因组.....	4
2.3.1 碱裂解法提取菌丝基因组.....	4
2.3.2 提取液 A 法提取菌丝基因组.....	5
2.3.3 商品化裂解液法提取菌丝基因组.....	5
2.3.4 SDS 法提取菌丝基因组.....	5
2.3.5 提取新鲜子实体基因组.....	5
2.3.6 提取烘干子实体基因组.....	5
2.3.7 提取多孔菌子实体基因组.....	5
2.4 滤纸片法提取菌丝基因组.....	6
2.4.1 制备滤纸片.....	6
2.4.2 基因组提取.....	6
3 结果.....	6
3.1 食用菌菌丝组织基因组提取.....	7
3.1.1 基因组提取.....	7
3.1.2 PCR 扩增后电泳.....	7
3.2 基因组模板快速制备及 PCR.....	8
3.2.1 碱裂解法快速提取基因组.....	8
3.2.2 提取液 A 法快速提取基因组.....	8
3.2.3 SDS 法快速提取基因组.....	9
3.2.4 提取灵芝基因组结果.....	9
3.2.5 食用菌新鲜子实体 PCR 模板基因组快速制备.....	10
3.2.6 多孔菌子实体 PCR 模板基因组快速制备.....	10
3.2.7 烘干食用菌 PCR 模板基因组快速制备.....	11

3.3 滤纸片法 PCR 模板基因组快速纯化.....	12
4 分析与讨论.....	12
4.1 食用菌菌丝组织基因组提取.....	12
4.2 基因组模板快速制备及 PCR.....	13
4.3 滤纸片法 PCR 模板基因组快速纯化.....	13
结论.....	13
参考文献.....	14
致谢.....	16

## 1 文献综述

随着世界的高速发展,我们对于生物的认识越来越深入,对于生物的研究已经进入了分子基因组学时代。基因组的高效提取和物种的快速检测,是研究各种生物的基础技术之一。因此快速、准确、灵敏的检测对于生物检测或者疾病控制等研究十分重要。另一方面,过去的十年里 Pac Bio 为代表的单分子测序技术已经成为目前基因组测序和转录组研究的基础,是一个可以用来进行生物样品测序、宏基因组 *de novo* 组装的稳定强大的技术。该技术的一个要求是需要微克级别的高分子量的 DNA (>40 kbp) 进行建库,该类的核酸不能通过常用的柱式提取法进行提取,因此获取高质量的基因组 DNA 十分有必要。

食用菌是一类可供人类食用的天然大型真菌<sup>[1]</sup>。食用菌 DNA 的提取在食用菌的基因工程占有非常重要的地位,尤其是在 PCR 检测食用菌这种方法的过程中非常重要<sup>[2-3]</sup>。然而许多食用菌由于独特的生物学构造,与其他微生物相比,食用菌的 DNA 制备较为困难<sup>[4-7]</sup>。提取食用菌 DNA 的方法有很多,如玻璃珠-盐析法、CTAB 法等<sup>[8]</sup>,虽然易润华等人对 CTAB 法进行了化简<sup>[9]</sup>,但这些方法在操作过程通常较为复杂,步骤较多且由于提取液的多次转移,容易引起交叉污染或者 DNA 丢失<sup>[10]</sup>。本研究的一个目的就是开发一种快速的提取高质量食用菌基因组的方法。

与此同时,生物技术的迅速发展已经使得 PCR 技术广泛的应用在食用菌遗传育种等各个领域<sup>[11]</sup>。但是目前没有适用于所有食用菌样品的 PCR 模板快速制备方法,商品化的直扩试剂盒也不能有效对食用菌所有的样本组进行有效 PCR 扩增<sup>[12][13]</sup>。本文第二个任务就是开发快速基因组提取的方法。本文使用的方法有:碱裂解法,提取液 A 法<sup>[14]</sup>、SDS 法、商品化裂解液法。

在没有实验室设备的情况下进行快速的基因组提取对于生物样本的快速检测十分必要,为了实现这一点。本文采用了新的试纸条法进行基因组提取<sup>[15]</sup>。试纸条法仅需要小于 10  $\mu\text{L}$  的液体,因此当样本非常少的时候非常好用。试纸条法的创新之处在于使用的材料成本非常低,并且能够迅速的获得核酸。

本文将对于食用菌菌种鉴定、遗传特性研究提供技术基础,促使食用菌的价值得到更好的开发利用。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

#### 2.1.1 材料

杏鲍菇菌丝、G10019 号菌丝、G10020 号菌丝、G10048 号菌丝 G10081 号菌丝、G10029 号菌丝、G10037 号菌丝、G10089 号菌丝、G10097 号菌丝、G10082 号菌丝、新鲜白玉菇、新鲜蟹味菇、新鲜鹿茸菇、烘干长根菇、烘干黑木耳、烘干羊肚菌、新鲜灵芝、烘干灵芝。

#### 2.1.2 试剂

70%的酒精，2.5 M 醋酸钾溶液，异丙醇，EDTA，结晶乙酸钠，SDS，氯化钠，盐酸胍，Triton X-100，Proteinase K，氯化镁，烟酸，PVP-40，Tris-base，EDTA，Tween 20。

提取液 A：10 mL 0.1 M EDTA，2.8 mL 2% SDS，0.27 g NaAc，0.58 g NaCl。

SDS 裂解液：2% SDS

碱裂解液：0.3 M NaOH

商品化裂解液 A：北京擎科新业生物技术有限公司，T 5 Direct PCR Kit (Plant)，200 rxns。

提取液 B：20 mM Tris-HCl (pH 8.0)，25 mM NaCl，2.5 mM EDTA，0.05% (w/t) SDS，2% (wt/vol) PVP-40

#### 2.1.3 实验仪器

超净台，研磨仪（上海净信，JXFSTPRP-24），电热恒温水浴锅（上海尚道仪器制造有限公司），恒温培养箱，常规 PCR 仪。

### 2.2 食用菌菌丝组织基因组提取

(1) 分别称取 0.3 g 杏鲍菇菌丝、G10019 号菌丝，G10020 号菌丝，G10048 号菌丝，G10081 号菌丝于 2 mL 离心管中，对应标号，分别加入 1.0 mL 的提取液 A，加入一个小钢珠，组织研磨仪 60 Hz，60 秒，破碎菌丝<sup>[17]</sup>。(2) 取出小钢珠，65 摄氏度的水浴锅中水浴 40 分钟。(3) 离心机中 10,000 rpm 离心 10 分钟。



图 2.1 经组织研磨仪研磨离心后的菌丝

(4) 取上清液 600  $\mu\text{L}$  分别转移至新的 1.5 mL 离心管中，依次对应标号，加入三分之二体积的 2.5 M 醋酸钾溶液 400  $\mu\text{L}$ ，轻轻颠倒混匀，0 摄氏度下冰水浴 40 分钟。(5) 离心机中 10,000 rpm 离心 10 分钟。



图 2.2 冰浴离心后的沉淀

(6) 取上清液 900  $\mu\text{L}$  分别转移至新的离心管 (1.5 mL) 中，依次对应标号，加入三分之二体积的异丙醇 600  $\mu\text{L}$ ，轻轻颠倒混匀，-20 摄氏度下保存 16 小时以上。(7) 离心机中 10,000 rpm 离心 10 分钟。(8) 弃上清液，加入 1 mL 70% 的酒精将沉淀悬浮，洗涤后离心机 10,000 rpm 离心 5 分钟，重复两次，(9) 倒出管内酒精，晾干后依次加入 100  $\mu\text{L}$  的 TE buffer 将沉淀悬浮，使混合均匀，悬浮后的沉淀可直接作为 PCR 的模板，-20 摄氏度下保存。(10) 琼脂糖凝胶电泳 20 分钟，观察结果。(11) 以提取的基因组为模板制作 ITS 程序<sup>[16]</sup>。

表 2.1 PCR 扩增体系

样品	酶	上引物	下引物	水	模板
样品 1	M 5 酶 (15 $\mu$ L)	ITS 1 (1 $\mu$ L)	ITS 4 (1 $\mu$ L)	无菌水 (12 $\mu$ L)	杏鲍菇菌丝 基因组 (1 $\mu$ L)
样品 2	M 5 酶 (15 $\mu$ L)	ITS 1 (1 $\mu$ L)	ITS 4 (1 $\mu$ L)	无菌水 (12 $\mu$ L)	G10019 号菌 丝基因组 (1 $\mu$ L)
样品 3	M 5 酶 (15 $\mu$ L)	ITS 1 (1 $\mu$ L)	ITS 4 (1 $\mu$ L)	无菌水 (12 $\mu$ L)	G10020 号菌 丝基因组 (1 $\mu$ L)
样品 4	M 5 酶 (15 $\mu$ L)	ITS 1 (1 $\mu$ L)	ITS 4 (1 $\mu$ L)	无菌水 (12 $\mu$ L)	G10048 号菌 丝基因组 (1 $\mu$ L)
样品 5	M 5 酶 (15 $\mu$ L)	ITS 1 (1 $\mu$ L)	ITS 4 (1 $\mu$ L)	无菌水 (12 $\mu$ L)	G10081 号菌 丝基因组 (1 $\mu$ L)

(12) PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳。

表 2.2 PCR 扩增程序

温度	时间	循环数
95 $^{\circ}$ C	3 min	1
98 $^{\circ}$ C	25 sec	
52 $^{\circ}$ C	25 sec	35
72 $^{\circ}$ C	15 s	
72 $^{\circ}$ C	2 min	1

## 2.3 PCR 扩增快速制备基因组

### 2.3.1 碱裂解法提取食用菌菌丝基因组

(1) 分别刮取少量鲜嫩的杏鲍菇菌丝、G10029 号菌丝、G10037 号菌丝、G10089 号菌丝、G10097 号菌丝、G10082 号菌丝鲜菌丝于 0.2 mL 的离心管中，依次标号 1、2、3、4、5、6，加入 10  $\mu$ L 0.3 M 氢氧化钠溶液，充分浸润。(2) 置于沸水浴中 4 分钟。(3) 加入 100  $\mu$ L 0.05 M Tris-HCl，移液枪吹打混合均匀后，瞬间离心，上清液可直接作为 PCR 实验的模板<sup>[18]</sup>。(4) 制作 ITS 程序，方法同上，进行 PCR 扩增。

### 2.3.2 提取液 A 法提取食用菌菌丝基因组

(1) 配制提取液, 准确的称量 10 mL 0.1 M EDTA, 2.8 ml 2% SDS, 0.27 g NaAc, 0.58 g NaCl, 蒸馏水定容至 20 mL。(2) 分别刮取少量鲜嫩的杏鲍菇菌丝、G10029 号菌丝、G10037 号菌丝、G10089 号菌丝、G10097 号菌丝、G10082 号菌丝鲜菌丝于 0.2 mL 的离心管中, 依次标号 7、8、9、10、11、12, 加入 10  $\mu$ L EDTA 提取液, 充分浸润。(3) 置于沸水浴中 10 分钟。(4) 加入 100  $\mu$ L 0.05 M Tris-HCl, 移液枪吹打混合均匀后, 瞬间离心, 上清液可直接作为 PCR 实验的模板。

### 2.3.3 商品化裂解液 A 法提取食用菌菌丝基因组

(1) 刮取少量杏鲍菇菌丝、G10029 号菌丝、G10037 号菌丝、G10089 号菌丝、G10097 号菌丝、G10082 号菌丝于 0.2 mL 离心管中, 依次标号 13、14、15、16、17、18, 分别加入 30  $\mu$ L 的裂解液 A, 金属水浴锅内, 95 摄氏度, 10 分钟。(2) 离心机中 12,000 rpm 离心 2 分钟 (3) 离心管中吸取 5  $\mu$ L 提取出基因组的裂解液 A, 同裂解液 B 进行等量稀释, 稀释后的样品可以直接作为模板使用。

### 2.3.4 SDS 法提取食用菌菌丝基因组

(1) 分别刮取少量鲜嫩的杏鲍菇菌丝、G10029 号菌丝、G10037 号菌丝、G10089 号菌丝、G10097 号菌丝、G10082 号菌丝鲜菌丝于 0.2 mL 的离心管中, 依次标号 19、20、21、22、23、24, 加入 10  $\mu$ L 2% SDS, 充分浸润。(2) 置于沸水浴中 10 分钟。(3) 加入 100  $\mu$ L 0.05 M Tris-HCl, 移液枪吹打混合均匀后, 瞬间离心一次, 上清液可直接作为 PCR 实验的模板。

### 2.3.5 提取新鲜子实体基因组

(1) 分别称取 0.1 g 新鲜蟹味菇、新鲜白玉菇, 新鲜鹿茸菇于 2 ml 离心管中, 放入一个的小钢珠, 组织研磨仪, 60 Hz, 60 秒。(2) 取少量研磨好的子实体于 0.2 mL 离心管中, 分别用碱裂解法、提取液 A 法、商品化裂解液法、SDS 法快速提取基因组。(3) 制作 ITS 程序, 方法同上, 进行 PCR 扩增。

### 2.3.6 提取干蘑菇基因组

分别称取 0.1 g 烘干长根菇、烘干羊肚菌、烘干黑木耳的干粉, 用组织研磨仪研磨。

### 2.3.7 提取灵芝基因组

称取 0.1 g 新鲜灵芝，用 2.3.5 中的方法进行 PCR 检测。

## 2.4 滤纸片法提取菌丝基因组

### 2.4.1 制备滤纸片

(1) 制备 1 L 的 Wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0)。(2) 将切片石蜡放到一个玻璃三角瓶中，将切片石蜡加热融化，注意不要接触到明火，因为石蜡也会燃烧。(3) 将石蜡倒入一个方形的小盒里面，将 75×100 mm 的滤纸的一段浸没到蜡里面，让蜡被滤纸吸收。(4) 一旦有 2/3 的滤纸吸收到了蜡就将滤纸片拿出来，上面保留 20 mm 的空白。(5) 将滤纸片取出，并且在培养皿边缘去除多余的蜡。(6) 将浸有蜡的滤纸片放到铝箔纸上面，冷却大约 1 min。(7) 用铅笔在距离蜡上沿大约 6 mm 的地方划一道线，这个长度就是核酸的结合区域。(8) 用剪刀沿着铅笔线将多余的滤纸减掉，只保留 6 mm 的核酸吸附区域。(9) 将滤纸片用彩色的 A 4 打印纸包裹住顶部的核酸吸附区域。(10) 用无菌的剪刀手动将滤纸片剪成宽度为 2 mm 左右的纸条。

### 2.4.2 基因组提取

(1) 准备分装试剂，Extraction buffer 和 Wash buffer 用 1.5 mL 的离心管分装，制备 PCR 反应体系采用 0.2 mL 的离心管进行分装。(2) 从组织中释放核酸，取少量杏鲍菇菌丝、G10029 号菌丝、G10037 号菌丝在盛有 Lysis buffer 的离心管中浸泡，加入小钢珠，手动晃动 10 s 即可。(3) 将试纸条完全浸没在核酸样品中，5 s。(4) 轻轻的在 800  $\mu$ L 的 Wash buffer 中蘸 5 次，大约 5 s。(5) 将试纸条在 20-50  $\mu$ L 的 PCR 反应体系中蘸 15 次，大约 10 s，即可直接进行 PCR 扩增。

## 3 结果

### 3.1 食用菌基因组的提取结果

#### 3.1.1 基因组提取结果

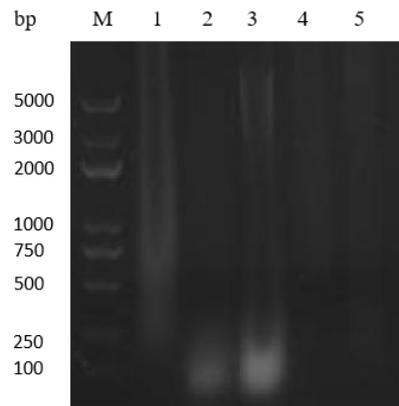


图 3.1 提取出的基因组电泳结果（从左到右：杏鲍菇、G10019、G10081、G10048、G10020）

如图 3.1 所示：图像中并没有明显的基因组条带，表明该方法并没有提取出基因组或者提取基因组浓度很低没有跑出基因条带。

#### 3.1.2 PCR 扩增后电泳结果

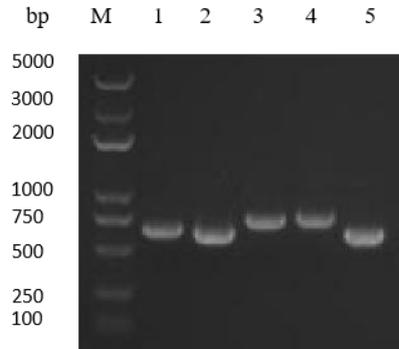


图 3.2 经过 PCR 扩增后的电泳结果（（从左到右：杏鲍菇、G10019、G10081、G10048、G10020）

如图 3.2 所示：经过 PCR 扩增，基因数量被扩大几百万倍后电泳图呈现出清晰的基因条带，该结果表明基因组提取结果无明显电泳条带的原因是提取出的基因组浓度很低导致无基因条带。

### 3.2 基因组模板快速制备及 PCR

#### 3.2.1 碱裂解法快速提取菌丝基因组

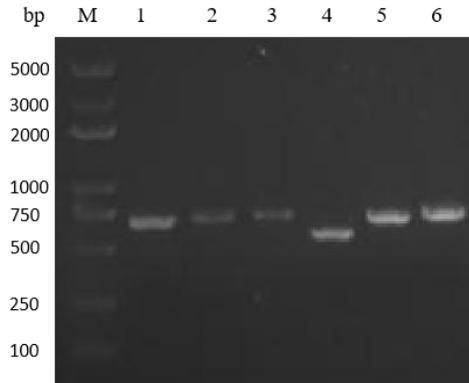


图 3.3 碱裂解法提取基因组扩增后的电泳结果（从左到右：杏鲍菇、G10082、G10097、G10037、G10089、G10029）

如图 3.3 所示：六种样品有六个不同的基因条带，表明该方法可以快速提取出基因组，基因条带明亮，表明提取效果良好。

#### 3.2.2 提取液 A 法快速提取菌丝基因组

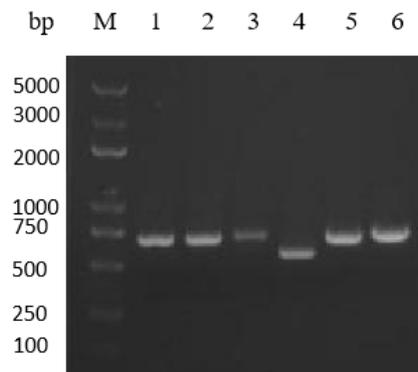


图 3.4 提取液 A 法提取基因组扩增后的电泳结果（从左到右：杏鲍菇、G10082、G10097、G10037、G10089、G10029）

如图 3.4 所示：不同的样品有不同的基因条带，基因组条带清晰，表明该方法可以提取出基因组。

### 3.2.3 SDS 法快速提取菌丝基因组

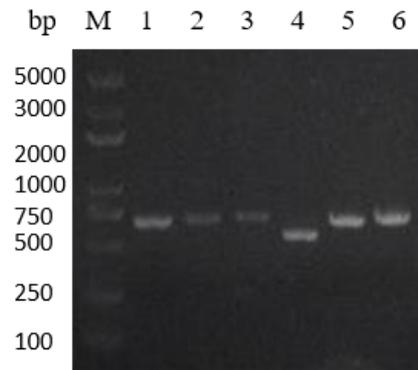


图 3.5 SDS 法提取基因组扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果（从左到右：杏鲍菇、GI0082、GI0097、GI0037、GI0089、GI0029）

如图 3.5 所示：基因组条带明亮，表明该方法可以提取出食用菌菌丝基因组。

### 3.2.4 商品化裂解液法快速提取菌丝基因组

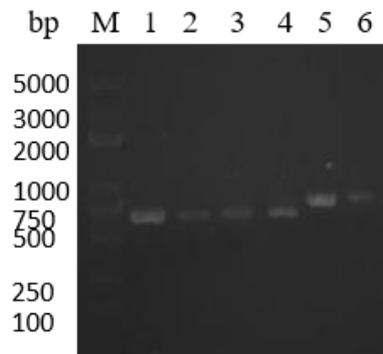


图 3.6 裂解液 A 法提取基因组扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果（从左到右依次为：杏鲍菇、GI0082、GI0097、GI0037、GI0089、GI0029）

如图 3.6 所示：由图像知，基因组条带明亮，表明该方法可以提取出食用菌菌丝基因组。

### 3.2.5 食用菌新鲜子实体 PCR 模板基因组快速制备

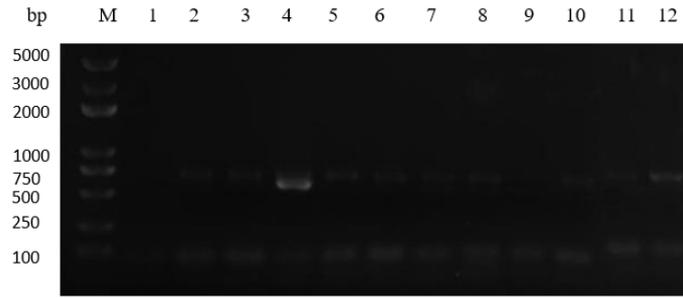


图 3.7 四种方法提取新鲜子实体基因组结果（1-4 为白玉菇，5-8 为鹿茸菇，9-12 为蟹味菇，其中，1、5、9 为商品化裂解液法，2，6，10 为碱裂解法，3、7、11 为 SDS 法，4、8、12 为提取液 A 法）

如图 3.7 所示：由图可知，由图可知裂解液 A 法可以提取出鹿茸菇基因组，碱提取法可以提取出白玉菇、鹿茸菇子实体，SDS 法可以提取出白玉菇、鹿茸菇和蟹味菇的子实体，提取液 A 法可以提取出白玉菇、鹿茸菇和蟹味菇的子实体。该结果表明，SDS 法和提取液 A 法适用于子实体基因组的快速提取，由二者基因条带亮度相比较可得，提取液 A 法的效果更好。

### 3.2.6 多孔菌子实体 PCR 模板基因组快速制备

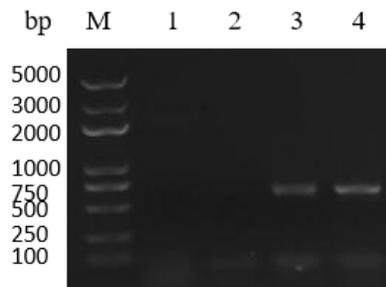


图 3.8 四种方法提取新鲜灵芝基因组结果（从左到右：裂解液 A 法，碱提取法，SDS 法，提取液 A 法）

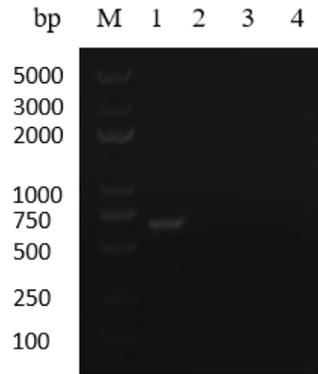


图 3.9 四种方法提取烘干灵芝基因组结果（从左到右：提取液 A 法，碱提取法，SDS 法，商品化裂解液法）

如图 3.8 和图 3.9 所示：由图知，新鲜灵芝基因组可由 SDS 法和提取液 A 法提取出来，烘干灵芝基因组可由提取液 A 法提取出来，由图像基因组条带亮度可知提取液 A 法的提取效果更好，更适合多孔食用菌子实体基因组的提取。

### 3.2.7 烘干食用菌 PCR 模板基因组快速制备

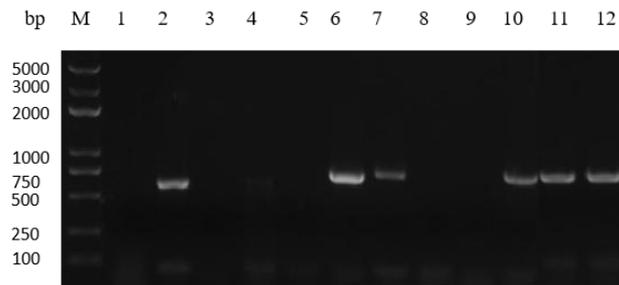


图 3.10 四种方法提取干蘑菇基因组结果（1-4 为烘干木耳，5-8 为烘干羊肚菌，9-12 为烘干长根菇，其中，1、5、9 为商品化裂解液法，2，6，10 为碱裂解法，3、7、11 为 SDS 法，4、8、12 为提取液 A 法）

如图 3.10 所示：烘干黑木耳可由碱提取法和提取液 A 法提取出，烘干羊肚菌可由碱提取法和 SDS 法提取出来，烘干长根菇可由碱裂解法、SDS 法和提取液 A 法提取出来。综上所述，碱提取法适合于提取烘干食用菌的基因组，且由图可知由该法提取出的基因组条带明亮，提取效果非常好，商品化裂解液 A 法均没有提取出基因组，表明商品化裂解液 A 法不适用于烘干食用菌基因组的提取。

### 3.3 滤纸片法 PCR 模板基因组快速纯化

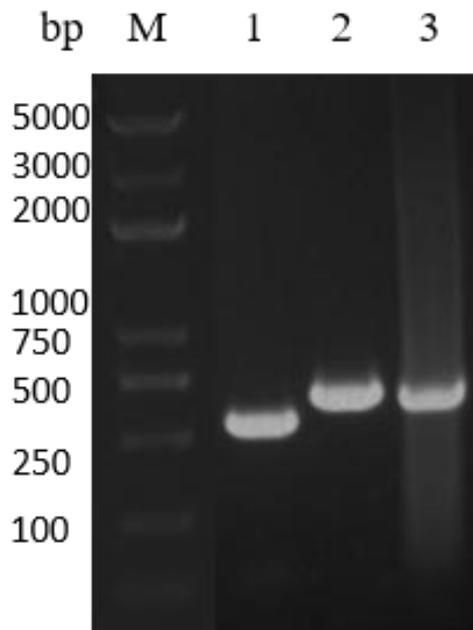


图 3.11 滤纸片法提取基因组结果

由图 3.11 知，滤纸片法提取出基因组条带清晰明亮，表明该法提取效果好。

## 4 分析与讨论

### 4.1 食用菌基因组提取

经验证，提取液 A 法可以用于提取食用菌基因组，但提取出的基因组含量较低，在整个实验过程中进行了多次重复性实验，经过琼脂糖凝胶电泳检验后出现明显基因组条带的实验次数很少，总结得出该方法可以用于提取基因组但成功率很低，根据图 3.2 显示经过 ITS 程序，PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳条带明显，清晰明亮，表明该方法更用于扩增 PCR 前的提取基因组操作，本实验选取了五种菌丝样品，全部成功提取出基因组且效果良好。与其他实验操作方法相比之下，该法操作过程简便，成功率极高，成本低廉，对实验药品、实验材料、实验条件的要求不苛刻，适用于实验室操作，也为部分不易快速提取基因组、难以提取基因组的菌种创造了一种简单易行的条件。

## 4.2 PCR 扩增快速制备基因组

提取菌丝基因组的实验结果表明，四种方法均可快速提取出菌丝基因组，根据电泳结果的图像可知提取液 A 法的电泳条带最清晰，表明该方法的提取食用菌菌丝效果最好。在实验操作流程和耗时方面相比之下碱裂解方法的耗时最短，操作最简便。根据新鲜子实体、烘干子实体、多孔菌子实体基因组的实验结果我们可以得出提取液 A 方法更适用于提取新鲜食用菌子实体基因组，SDS 方法更适用于提取烘干食用菌子实体基因组，提取液 A 方法更适用于提取灵芝基因组。综上所述，提取液 A 方法在提取菌丝，子实体，灵芝方面都有很好的效果，是快速提取食用菌基因组的首选方法。

## 4.3 滤纸片法 PCR 模板基因组快速纯化

经实验验证，滤纸片法对于 PCR 模板基因组快速纯化效果良好，该方法提取基因组用时短，仅需 30 秒左右，提取效果良好，是不可多得的好方法。尽管有很多可以捕获（吸收）核酸的材料，纤维素的基质可以吸收核酸，并且在洗脱步骤不会被洗脱下来，很多污染物就会被留在 Wash solution 中。PCR 体系中的化合物以及多次洗脱的动作可以保证核酸被释放出来。使用原始的纤维素还有一个优点就是不需要使用一些失活的化学物质例如高浓度的盐，这些化合物可能会影响 PCR 反应。由于不使用失活的环境，因此也不需要 70%乙醇进行洗脱，后者也会抑制 PCR 反应。

## 结论

食用菌基因组提取实验由于未能提取出大量的基因组，可以初步判断实验未能成功，通 PCR 扩增后可得到清晰明亮的基因组条带，表明该法可以提取出基因组，但具体操作过程还需进一步优化，在该法在实验操作过程中，操作简便，成本低廉，未使用酚等难以去除的试剂，是一种可取的基因组提取方法。PCR 快速扩增采用的几种快速提取基因组的方法均可快速提取出基因组，由实验结果得出，提取液 A 方法提取效果好、提取时间短、操作过程简单，所用试剂很常见、成本低廉，且适用于菌丝，子实体、灵芝的基因组提取，是大规模快速提取基因组或实验室快速提取基因组的一种可提倡的好方法。本文采用的试纸条法也具有较好的提取效果，本研究将为食用菌组织的快速鉴定提供可靠的实验基础。

## 参考文献

- [1] 邓叔群.中国的真菌.北京科学出版社,1963 年.
- [2] Kashiwagi K Y. High-through put genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. J Biosci Bioeng 2006,102 ( 6):572-574.
- [3] Haugland R A, Varma M, Wymer L J, et al. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*. *Penicillium* and *Paecilomyces* species. Syst Appl Microbiol 2004,27(2):198-210.
- [4] Löffler J, Hebart H, Schumacher U, et al. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal Pathogens from cultures and blood [J]. Clin Microbiol,1997,35(12): 3311.
- [5] Hayden R T, Qian X, Roberts GD, et al. In situ Hybridization for the identification of yeast like organisms in tissue section [J]. Diagn Mol Pathol,2001,10(1):15.
- [6] Honore-Bouakline S, Vincensini S P, Giacuzzo V, et al. Rapid diagnosis of extra pulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction [J]. Clin Microbiol,2003,41(6):2323.
- [7] Velegraki A, Kambouris M, Kostourou A, et al. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification [J]. Med Mycol,1999,37(1):69.
- [8] 杨艳秋,王丽,贺丹.真菌 DNA 提取方法的建立和比较[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11( 50):10093-10096.
- [9] 易润华,朱西儒,周而勋.简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J].湛江海洋大学学报,2003,23(6):72-73.
- [10] 崔菲,王子岚,高品红.用于 PCR 快速检测的真菌基因组 DNA 制备研究进展[J].河北林果研究,2011,26(3):286-288.
- [11] 王兰,龙云铭,刘耀光.一种用于 PCR 的植物基因组 DNA 快速制备方法[J].分子植物育种,2009,7(2):425-428.
- [12] 孙川,陈刚,饶玉春,张光恒,高振宇,刘坚,鞠培娜,胡江,郭龙彪,钱前,曾大力.水稻基因组 DNA 简易制备方法.中国水稻科学,2010,24(6):677-680.
- [13] 陈欲,汪小福,陈笑芸,彭城,徐俊锋,李玥莹.基因组 DNA 快速提取及在转基因大豆检测中的应用.中国油料作物学报.2021.43(1):70-76.
- [14] Zhou X, Li Q, Zhao J, et al. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to PCR identification of medicinal mushroom *Ganoderma* spp[J]. Prep Biochem Biotechnol,2007, 37(4):369-380.
- [15] Mason M G, Botella J R. Rapid(30-second), equipment-free purification of nucleic acids

- using easy-to-make dipsticks[J]. *Nature Protocols*,2020,15(11):3663-3677.
- [16] 申超峰,周玲红,彭丁文,刘跃荣,周闰.一种适于 PCR 扩增的茶树基因 DN 快速提取方法[J]. *茶叶通讯*.2020,194(04):45-48.
- [17] Sun Lin, Siddique Muhammad K, Wang Lei, Li Songjing. Mixing characteristics of a bubble mixing microfluidic chip for genomic DNA extraction based on magnetophoresis: CFD simulation and experiment.[J]. *Electrophoresis*, 2021.3390-3394.
- [18] 李海超,秦保平,王健,蔡瑞国,周印富,刘春晓,刘强,刘铁山,杨晴,韩金玲,杨敏.一种基于 PCR 的简易快速提取植物叶片 DNA 的方法[J].2019,38(11):151-154.

## 致谢

2021年的六月，青岛的夏天给了我许多期待，在这个呆了四年的地方，我开始一字字敲下属于我的毕业论文致谢，青农大给过我欢笑也曾留下遗憾。唯愿我的母校如2017年依旧初见之时般沉稳美好，唯愿我以后能多多学习，再勇敢一点。

感谢每一位在我的生活或者学习上有过帮助的老师，特别感谢我的导师于浩老师，从论文选题到正式成稿，都离不开于老师的悉心指导。

感谢我的父母家人，无论是精神上还是物质上，都给予我最大的支持，感谢你们为我创造了一个轻松愉快的家庭，赋予我23年的乐观人生态度，祝愿你们健康快乐。

感谢陪伴我大学四年生活的舍友和同学，尤其是我的师姐邱田美，同学李振启、梁晶杰，感谢朋友们四年来给予的关怀和照顾，祝愿所有同学前程似锦。

最后感谢自己，熬过了夏日的酷暑冬日的寒风，如愿考上了心仪大学的研究生。

青山不改，绿水长流，后会有期。